

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern
Abteilung für Entwicklungs- und Tumorbologie
Direktor: Prof. Dr. F. E. Lehmann

**Unterschiedliche Reaktionen
genetisch verschiedener Rattenstämme
auf die Implantation von
Walker-Carcinom-256**

Demonstriert an der Histologie wachsender und regredierender
Walker-Carcinome

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

VIKTOR MEYER

von Hasliberg/BE

Sonderabdruck aus der Zeitschrift für Krebsforschung
Bd. 68, S. 352–365, 1966

Von der medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn
Prof. Dr. H. Cottier zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 14. Juli 1966.

Der Dekan der medizinischen
Fakultät:
Prof. Dr. F. Escher.

Unterschiedliche Reaktionen genetisch verschiedener Rattenstämme auf die Implantation von Walker-Carcinom-256*

Demonstriert an der Histologie wachsender und regredierender Walker-Carcinome

VIKTOR MEYER

Abteilung für vergleichende Entwicklungs- und Tumorbologie des Zoologischen Institutes
der Universität Bern (Leitung: Prof. Dr. F. E. LEHMANN)

Eingegangen am 25. April 1966



* Mit Unterstützung von Arbeitsbeschaffungsmitteln des Bundes und von Beiträgen des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ausgeführt.

Daß das Schicksal transplantierte Zellgruppen von Tumoren durch genetische Faktoren entscheidend beeinflußt werden kann, wurde schon zu Beginn dieses Jahrhunderts vermutet. LITTLE (1914) hat erstmals ausdrücklich auf die Beteiligung genetischer Faktoren bei Tumortransplantationen hingewiesen. In den folgenden Jahren konnte diese Hypothese bewiesen und ausgebaut werden und gipfelt im Postulat der Histokompatibilitätsgene (LITTLE, 1941 und 1947 und SNELL, 1948). Diese Erkenntnisse gründen sich auf Versuche mit isogenen Mäusestämmen, deren F_1 - und F_2 -Hybriden sowie Rückkreuzungen, wobei der verwendete Tumor aus einem der benutzten Inzuchtstämme stammte.

Da in unserem Laboratorium über die Wachstums- und die Enzymbiologie von Rattentumoren gearbeitet wurde (BENZ und LEHMANN, 1959), richtete sich unser Augenmerk insbesondere auf das gut transplantierbare Walker-Carcinom. Für die Fortsetzung unserer Studien an Ratten sprach bereits eine Reihe positiver Ergebnisse bei den bisher angestellten Versuchen:

a) Die Verwertbarkeit von Homogenaten oder histochemisch angefärbten Schnitten zum Nachweis der Kathepsine, der sauren Phosphatasen und der Aminopeptidasen, die sich alle als organotypisch verteilt erwiesen haben (LEHMANN, SCHMIDT und VON HAHN, 1965).

b) Das Vorhandensein resistenter und sensibler Tiere gegenüber Tumortransplantaten.

c) Die histologisch verschiedenartige Reaktionsweise von sensiblen und resistenten Ratten gegenüber dem Walker-Tumor.

d) Der histologisch gut faßbare und verschiedenartige Verlauf der Tumorentwicklung bei resistenten und sensiblen Tieren.

Ausgehend von einer CFN-Rattenpopulation (Carworth-Farm, New York) haben wir genetische Stammlinien, die verschieden reagierten, isoliert und die Phänomenologie des Tumorstwachstums auf den verschiedenen Stämmen sowie das histologische Geschehen bei wachsenden und spontan regredierenden Tumormplantaten untersucht (LEHMANN und MEYER, 1963). Es ist die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die damals erhobenen Befunde zu bestätigen und zugleich durch ausreichende histologische Bilder zu belegen.

1. Material und Methoden

Bei unseren Versuchstieren handelte es sich um CFN-Ratten. Es sind dies Nachkommen eines nicht in direkter Inzucht gehaltenen Wistarstammes. Sie wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 23° C gehalten. Als Futter gelangten Preßwürfel (Altromin R4, Diätf orm 4/14-16 der Firma Kunath Aarau) und Wasser ad libitum zur Verwendung. Die zur Implantation verwendeten Ratten waren 4—6 Monate alt. Die Gewichte lagen für Weibchen zwischen 250 und 350 g, für Männchen zwischen 350 und 450 g. Die Tiere wurden mittels Ohrnummern individuell markiert. Es wurde darauf geachtet, daß in einem Käfig Nachkommen der verschiedenen Stämme gemischt gehalten wurden, um dadurch einen eventuellen „cage effect“ auszuschalten.

Als Tumor benutzten wir das Walker-Carcinom-256, das uns von Dr. STRÄULI, Pathologie Zürich, überlassen wurde. Zur Transplantation wurde ein unter sterilen Kautelen gewonnener Tumorgewebebrei ohne irgendwelche Zusätze subcutan in die rechte Flanke injiziert. Auf Grund von Vorversuchen standardisierten wir die Implantationsmenge auf 100 mg Tumornaßgewicht. Nach der Methode von SCHRECK (1935) wurde das Tumorstadium durch Messung der beiden größten Tumordurchmesser laufend verfolgt. Für die graphischen Darstellungen wurde nach der von SCHRECK angegebenen Formel das Tumorstadium berechnet.

2. Beurteilung der Transplantationsergebnisse

Als *sensibel* werden alle Tiere, die an den Folgen des progressiven Tumorstadiums gestorben sind, bezeichnet. Ein Beobachtungsgut von über 60 Fällen hat zudem gezeigt, daß Tiere, bei denen palpable Metastasen (axilläre Lymphknoten) auftreten, mit Sicherheit prospektiv als *sensibel* beurteilt werden können.

Als *resistent* fassen wir alle Tiere zusammen, die nicht an den Folgen des implantierten Tumors zugrunde gehen. Die Reaktion dieser Tiere ist jedoch sehr verschieden: Bei den einen entsteht an der Implantationsstelle nur eine kleine Schwellung, die nach etwa 7 Tagen wieder verschwunden ist; bei anderen entwickelt sich ein großer Tumor, der sich aber wieder zurückbildet. Die übrigen resistenten Tiere liegen in bezug auf ihr Tumorstadium zwischen diesen beiden Extremfällen; sie bilden zahlenmäßig den größten Teil. Wegen des breiten Reaktionsspektrums haben wir die resistenten Tiere willkürlich in zwei Gruppen aufgeteilt: Erreicht das arithmetische Mittel der beiden größten Tumordurchmesser eines Tieres 1,5 cm oder mehr und verschwindet der Tumor in der Folge wieder vollständig, so bezeichnen wir dies als *Regression*; die übrigen Tiere, die diesen mittleren Tumordurchmesser nicht erreichen, werden als *Tumor-Nichtaufnahme* (no take) klassiert.

3. Selektionsverfahren

Ausgehend von der Reaktion von 20 direkt importierten CFN-Ratten (10 Weibchen und 10 Männchen) wurden präsumptiv sensible, resistente sowie gemischt reagierende Stammlinien zur Zucht angesetzt (LEHMANN und MEYER, 1963). Während der ersten Transplantationspassagen verwendeten wir als Tumorspender Tiere der verschiedenen Linien. Von der dritten Inzuchtgeneration an wurde nur noch Tumor von Tieren der beiden sensiblen Stämme C und H weitertransplantiert. Wir sind uns bewußt, daß durch dieses Verfahren die Tumorzellpopulation, die als heterogen angenommen werden muß, in bezug auf die resistenten Stammlinien einer einseitigen Selektion unterworfen wird. Da wir vor allem Tumorstadiumsregressionen zu untersuchen wünschten, verwendeten wir zur Nachzucht der resistenten Stammlinien Tiere, die dieses Phänomen in ausgeprägter Weise gezeigt haben.

Ergebnisse

Vorerst soll die Phänomenologie des Tumorstadiums auf den verschiedenen Stammlinien dargestellt werden. In einem zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse histologischer Studien an wachsenden und spontan regredierenden Walker-Carcinomen mitgeteilt.

A. Phänomenologie des Tumorwachstums auf genetisch verschiedenen Rattenstämmen (synoptische Darstellung)

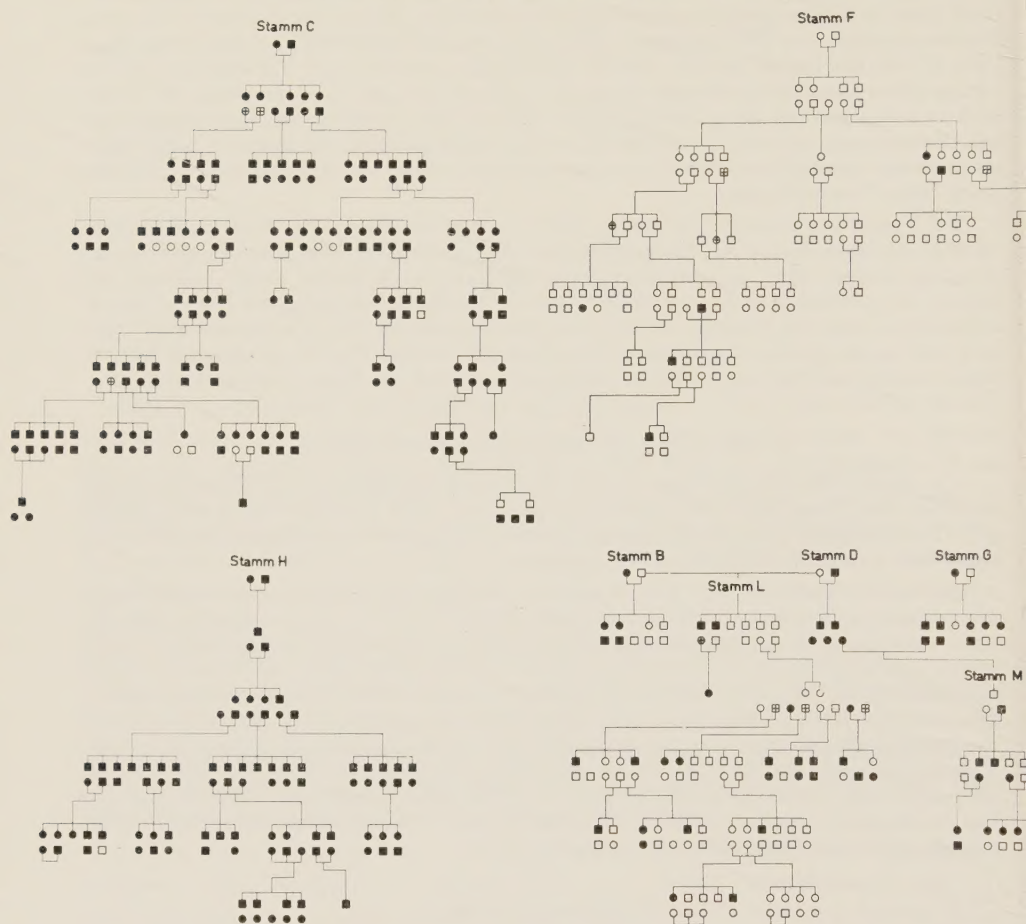


Abb. 1. Stammbäume der durch Selektion gewonnenen Stammlinien. ● ■ sensibel Tiere; ○ □ resistent Tiere; ⊕ ⊞ nichtgetestete Tiere

Die Stammlinien B, D, G und M wurden nicht weitergeführt.

Tabelle 1. Reaktion der verschiedenen Stammlinien gegenüber Walker-Carcinom

Stamm	Anzahl Tiere	Sensibel	Resistent	Regression	TU-Nichtannahme
C	182	171 (94%)	11 (6%)	8 (4,5%)	3 (1,5%)
H	96	95 (99%)	1 (1%)	—	1 (1%)
F	115	8 (7%)	107 (93%)	70 (61%)	37 (32%)
L	94	25 (27%)	69 (73%)	51 (54%)	18 (19%)

1. Tumorwachstum bei sensiblen Tieren

a) Vergleich des Tumorwachstums auf den beiden sensiblen Stämmen C und H.

Geschlechtsunterschiede: Die Individualstreuung innerhalb der Geschlechter ist größer als die möglichen Geschlechtsunterschiede.

Die Mittelwerte der mittleren Tumorumfänge beider Stämme zeigten an keinem der Tage 4—11 signifikante Unterschiede.

b) Überlebenszeiten von C- und H-Tieren. C-Tiere: $15,6 (\pm 0,44)$ Tage, H-Tiere: $14,4 (\pm 0,46)$ Tage.

Diese Überlebenszeiten sind nicht statistisch signifikant verschieden.

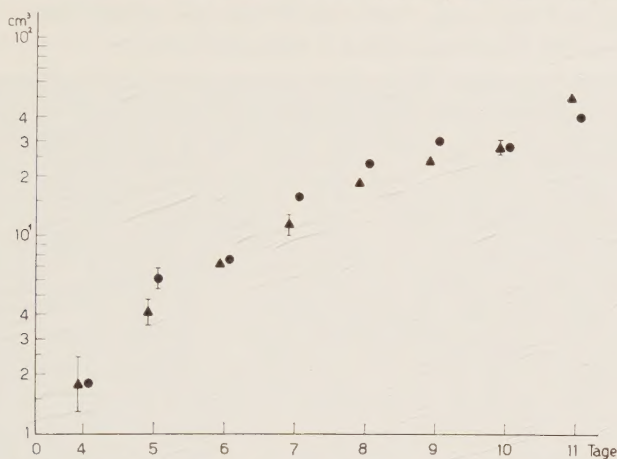


Abb. 2. Tumorgöße auf Stamm C und H, 4.—11. Tag nach Implantation. Ordinate: Mittleres Tumorumfänge in cm^3 . (Bei Werten ohne eingezeichnete Streuung liegt diese innerhalb der Kreise = Stamm C bzw. Dreiecke = Stamm H)

c) Gewichtsverlauf bei sensiblen Tieren. Bis zum Tode verlieren diese ca. 20% des ursprünglichen Körpergewichtes. Der Tumor nimmt im Mittel 15—20% des Gewichts des toten Tieres (totes Tier mit Tumor) ein. Zu diesem Zeitpunkt besteht der Tumor mindestens zu 70% aus nekrotischem Gewebe.

d) Diarrhoe bei sensiblen Tieren. Parallel zum progressiven Tumorstadium findet man bei sensiblen Tieren in zunehmendem Maße Durchfälle. Die nebenstehende Tabelle zeigt den rapiden Anstieg von Diarrhoe nach dem 10. Tag.

Die Diarrhoe ist ein sicheres Zeichen des nahen Exitus letalis. Von 50 beobachteten Tieren, bei denen im Laufe des Tumorstadiums Diarrhoe auftrat, sind alle spätestens 3 Tage nach Auftreten des Durchfalles gestorben. Die Häufigkeit der Diarrhoe ist für Tiere mit intakten Tumoren die gleiche wie für solche, bei denen der Tumor die Haut durchbrochen hat und zum mindesten oberflächlich infiziert ist. Aus Zeitgründen wurden keine Versuche zur Abklärung dieses Phänomens unternommen.

Tabelle 2. Häufigkeit von Diarrhoe bei sensiblen Tieren

Tage nach Implanta- tion	Tiere mit Diarrhoe %	Anzahl der beobach- teten Tiere
7—8	0	216
9	4	79
10	15	74
11—13	25	205
14—15	50	105
16—17	55	47
18—20	70	20

2. Tumorstadium bei resistenten Tieren

Abbildung 3 zeigt, in welchen Grenzen sich das Tumorstadium auf resistenten Tieren bewegt. Zum Vergleich ist die Mittelwertskurve von sensiblen Tieren (C und H) mit dargestellt. Man sieht deutlich, daß aus der Tumorstadiumgröße allein keine Schlüsse in bezug auf Sensibilität bzw. Resistenz der Tiere gezogen werden dürfen.

Bei den Tieren, die Tumorregressionen zeigen, findet der Tumorstillstand in der Regel zwischen dem 8. und 16. Tag statt. Für die vollständige Resorption des Tumors werden, vom Wachstumsstillstand an gerechnet, Zeitspannen von 6—60 Tagen beobachtet.

Resistente Tiere erweisen sich auch bei Zweitimplantation zu 100% resistent (s. a. FROHBERG und MATTHIES, 1957, und WRBA und RABES, 1962). *Regressionen können jedoch nur bei Erstimplantationen beobachtet werden.*

a) *Überlebenszeit sensibler Tiere des vorwiegend resistenten Stammes L.* Dies beträgt im Durchschnitt 19,5 ($\pm 1,14$) Tage. Sensible L-Tiere überleben als

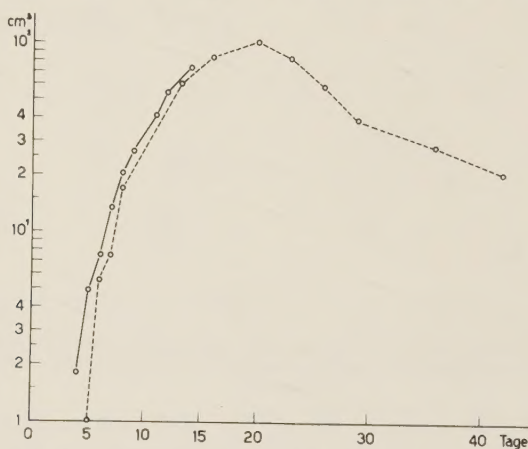


Abb. 3. Tumorwachstum bei resistenten Tieren. Ordinate: Mittleres Tumolvolumen in cm^3 . ---- Wachstumskurve eines resistenten Tieres (Extremfall einer Tumorregression; bei extremen Tumor-Nichtannahmen wird ein Tumolvolumen von 1 cm^3 nicht erreicht). — Mittelwertskurve sensibler Tiere (zum Vergleich)

rund 5 Tage länger als C- und H-Tiere. Der Unterschied ist statistisch gesichert ($p < 1\%$). Es zeigt dies, daß nicht nur tumorresistente, sondern auch tumorsensible Tiere in ihrer Reaktion graduelle Unterschiede aufweisen können.

b) *Gewichtsverlauf bei resistenten Tieren.* Im Vergleich zum massiven Gewichtsverlust, den sensible Tiere im Verlauf des Tumorwachstums erleiden, ist bei resistenten Tieren nur bei solchen, die sehr große Tumoren entwickeln, eine Gewichtsabnahme von max. 15%, die sich aber rasch wieder normalisiert, zu beobachten. Das Gewicht der übrigen Tiere bleibt innerhalb der normalen Tagesschwankungen.

c) *Diarrhoe bei resistenten Tieren.* Im Verlauf des Tumorwachstums und der Tumorregression auf resistenten Ratten konnte in *keinem einzigen Fall Diarrhoe* festgestellt werden. Bei denjenigen Tieren der Stämme F und L, die sensibel reagierten, traten indessen Durchfälle mit gleicher Häufigkeit wie bei Stamm C und H auf.

B. Histologie progressiv wachsender und spontan regredierender Tumoren verschiedener Entwicklungsstadien

1. Frühstadien

Auffallende Unterschiede zwischen sensiblen und resistenten Tieren findet man erst nach dem 7. Tag. Alle früheren Stadien zeigen prinzipiell denselben histolo-

gischen Aufbau. Die Stadien 6, 24 und 48 Std nach der Implantation weisen eine starke Infiltration des Implantates und der Umgebung durch neutrophile Granulocyten auf. Nach 48 Std sieht man zusätzlich eine starke histiocytäre Reaktion und die Bildung vieler Kapillarknospen. Das Infiltrat von neutrophilen Granulocyten ist am 4. Tag in geringem Ausmaß noch vorhanden; am 7. Tag ist es vollständig verschwunden. Am 4. Tag findet man eine intensive Bildung von Granulationsgewebe, das von zahlreichen Histiocyten, in geringerer

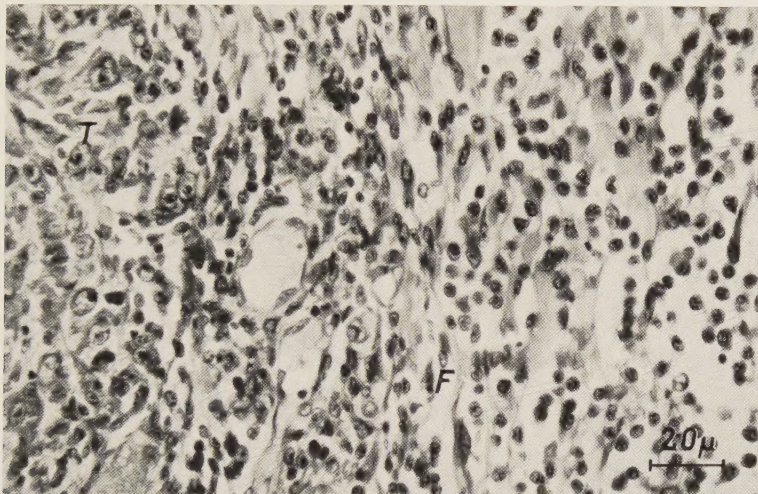


Abb. 4. Tumorimplantat am 7. Tag. Dieses Bild ist für sensible und resistente Tiere repräsentativ: Die Tumorzellen (*T*) stellen zu diesem Zeitpunkt einen soliden Verband dar. Darum herum bildet sich eine bindegewebige Kapsel, die zu diesem Zeitpunkt nur aus einem lockeren Fibrocytensaum (*F*) mit vielen Gefäßen besteht. Dieser ist, wie auch die weitere Umgebung des Implantates, von zahlreichen, vorwiegend kleinen Lymphocyten infiltriert. Plasmazellen sind nur in geringer Zahl vorhanden

Zahl auch von Lymphocyten durchsetzt ist. Der größte Teil des Implantates ist nekrotisch; die noch vorhandenen vitalen Tumorzellen bilden noch immer eine ganz lockere Formation, die allseitig von Granulationsgewebe durchzogen wird; nur an vereinzelten Stellen haben sie sich zu einem soliden Verband vereinigt. Es finden sich auch zahlreiche primitive Blutgefäße.

Am 7. Tag bilden alle Tumorzellen einen soliden Verband, in dem man stellenweise kleine Nekroseherde findet. Um den Tumor findet man eine feine, bindegewebige Kapsel, die zu diesem Zeitpunkt nur aus einem schmalen Fibrocytensaum besteht. Dieser ist, wie auch das umgebende Bindegewebe, stark rundzellig infiltriert. Das Infiltrat setzt sich vorwiegend aus Lymphocyten zusammen, Plasmazellen sieht man nur vereinzelt (Abb. 4). Diese rundzellige Infiltration trifft man bei sensiblen und resistenten Tieren in ungefähr gleichem Ausmaß an.

2. Spätstadien

Am 10. Tag sieht man nun auf sensiblen und resistenten Tieren sehr verschiedene Bilder. Das Tumorwachstum schreitet auf sensiblen Tieren progressiv fort, und parallel dazu nimmt die rundzellige Infiltration des umgebenden Wirtsgewebes ab (Abb. 5a). Bei resistenten Tieren erfolgt eine weitere Zunahme der lymphocytären Infiltration (Abb. 5b). Zudem sind bei vielen Tieren sämtliche Tumor-

zellen schon zugrunde gegangen. Bei Tieren, die noch vitales Tumorgewebe aufweisen, wird dieses durch zellreiche Stränge aus Granulationsgewebe in kleine Bezirke unterteilt. Bei etwa der Hälfte der resistenten Tiere sind zu diesem Zeitpunkt nur noch vereinzelt vitale Tumorzellen vorhanden.

Lymphocyten sieht man fast nie in direktem Kontakt mit Tumorzellen. Zwischen Tumorzellen und Lymphocyten findet sich meist ein schmaler Fibroblastensaum oder ein Saum von mit Makrophagen durchsetztem Granulations-

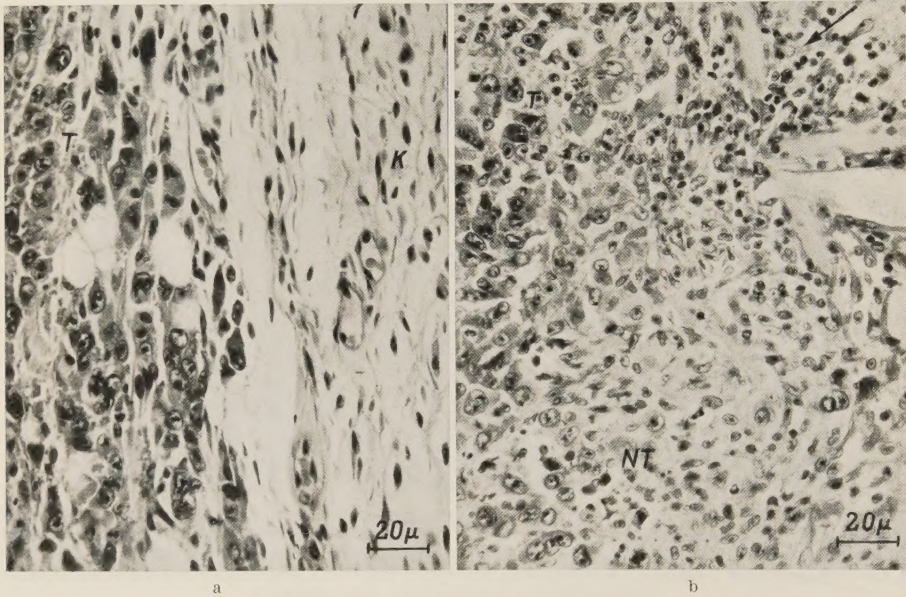


Abb. 5. a 10 Tage alter Tumor auf sensiblen Tier. Vorwiegend expansives Tumorstadium; die lymphocytäre Infiltration des Wirtsgewebes ist fast vollständig verschwunden (T Tumor, K Kapsel). b 10 Tage alter Tumor auf resistentem Tier (Tumor-Regression). Das zum größten Teil nekrotische Tumorumplantat wird von zellreichen Strängen aus Granulationsgewebe durchzogen (die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem solchen Strang). Das Granulationsgewebe ist von Lymphocyten (z.T. in Haufen, z.T. in lockerer Formation) und Makrophagen durchsetzt (T vitale Tumorzellen, NT nekrotische Tumorzellen, ↑ Lymphocytenhaufen)

gewebe. Dieses zeigt, wie schon erwähnt, eine ausgesprochene Tendenz, in den Tumor einzusprossen. Besonders gut sieht man dies bei langsam verlaufenden Tumorregressionen (Abb. 6: 16. Tag und Abb. 7: 23. Tag). Die beiden Abbildungen zeigen auch, daß sich die rundzelligen Infiltrate zum größten Teil aus kleinen Lymphocyten zusammensetzen. In geringerer Zahl sieht man auch relativ große Lymphocyten. Plasmazellen findet man fast keine.

3. Verschiedenartige Reaktionen resistenter und sensibler Tiere auf nekrotisches Tumorgewebe

a) Bei resistenten Tieren zeigt die unmittelbar an die Tumornekrose angrenzende Kapsel eine deutliche zonale Gliederung im Sinne einer Fremdkörperreaktion. Von der Tumornekrose zur Kapselperipherie hin lassen sich folgende Schichten voneinander abgrenzen: Phagocytosezone, Granulationsgewebe, faseriges Bindegewebe, dichtes kollagenes Bindegewebe.

Phagocytosezone. Sie wird durch einen Saum intensiv phagozytischer Makrophagen und mehrkerniger Riesenzellen gebildet. Die Makrophagen lagern sich stellenweise zu epithelialen Verbänden zusammen. Das Auftreten mehrkerniger Riesenzellen ist typisch für fortgeschrittene Regressionsstadien. Man findet sie in der Regel erst vom 16. Tag an.

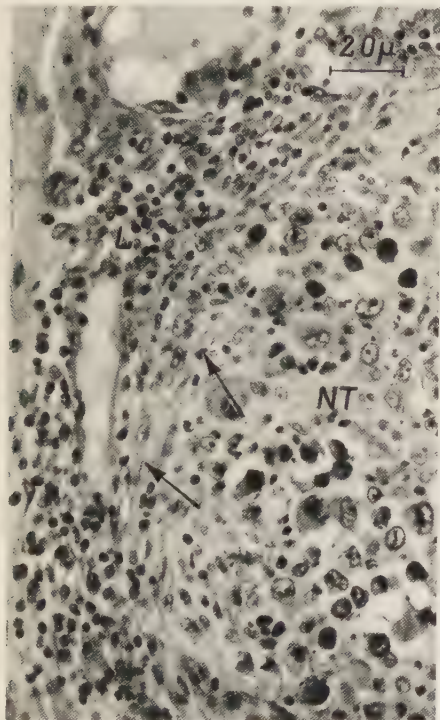


Abb. 6

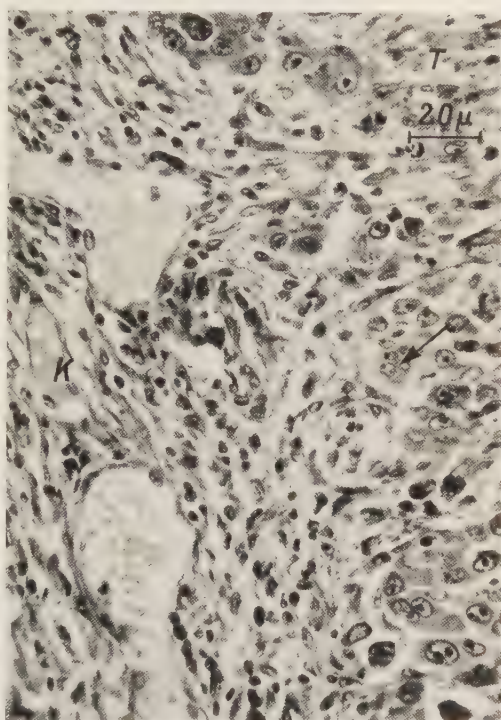


Abb. 7

Abb. 6. Tumorregression (16. Tag). Degenerierendes Tumorzellnest (NT) von Lymphocytenwall (L) umgeben. Zwischen Lymphocyten und Tumorzellen findet sich ein schmaler Saum von Fibroblasten (↑) mit andeuteter Tendenz, in den zum größten Teil nekrotischen Tumorbezirk einzusprossen

Abb. 7. Ausgesprochen langsam verlaufende Tumorregression (23. Tag). Die gefäßreiche Tumorkapsel ist dicht von kleinen Lymphocyten infiltriert (K). Zwischen Lymphocyteninfiltrat und Tumor (T) sieht man Fibroblasten, die eine ausgeprägte Tendenz, in das Tumorgewebe einzusprossen, aufweisen. Auffallend sind die vielen mehrkernigen Tumorzellen (↑) (Degenerationszeichen)

Granulationsgewebe. In seinem Maschenwerk finden sich in wechselnder Dichte Makrophagen, die mit phagozytiertem Material vollgestopft sind, und Lymphocyten. Dort, wo sich der Verband nekrotischer Tumorzellen infolge Verflüssigung lichtet, durchbricht es die Phagocytosezone, wächst zapfenförmig in die Tumornekrose ein und kapselt kleinere Nekrosebezirke ab (Abb. 8a). Dadurch wird diese in kleinere „follikelartige“ Bezirke unterteilt. Um diese „Nekrosefollikel“ baut sich ein der Tumorkapsel entsprechend zonal gegliedertes Gewebe auf.

Faseriges Bindegewebe. Diese folgt auf das Granulationsgewebe. Es ist häufig von dichten Lymphocyteninfiltraten durchsetzt, die sich wallartig über große Strecken ausdehnen können. Hier finden wir z. T. zu epithelialen Verbänden zusammengelagerte, vollgestopfte Makrophagen und zusätzlich Haufen

hämosiderinhaltiger Phagocyten. Die äußeren Schichten dieses faserigen Bindegewebes sind reichlich von Blutgefäßen durchzogen.

Dichtes kollagenes Bindegewebe. Gegen die Kapselperipherie hin verdichtet sich das lockere, faserige Bindegewebe zu einem relativ zellreichen, dichten,

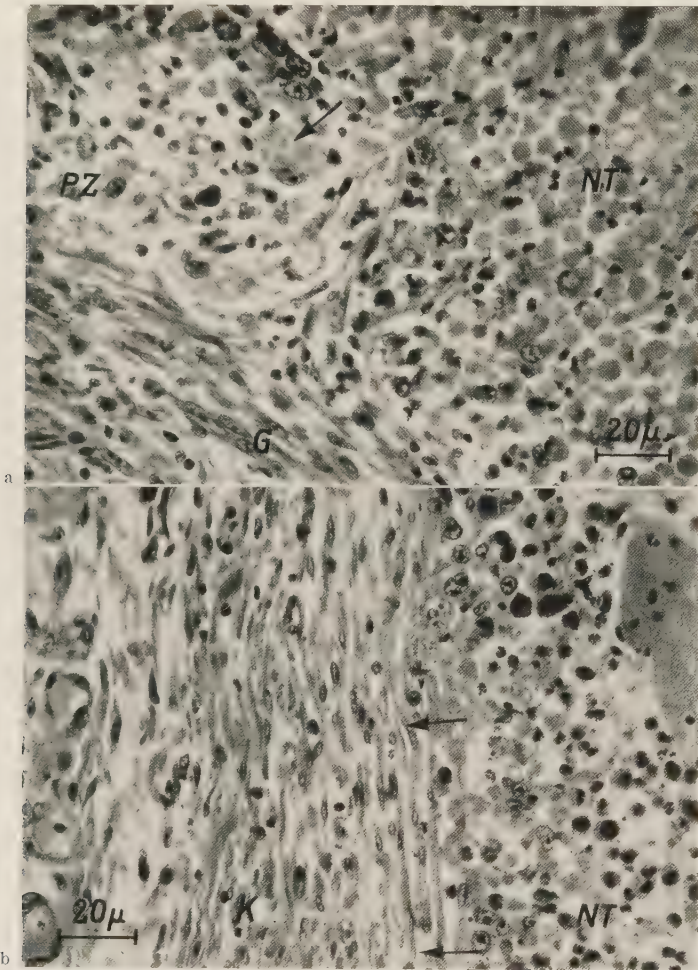


Abb. 8. a Fortgeschrittene Tumoregression (16. Tag). Intensive Organisation und Resorption der Tumornekrose. Es sind nur noch vereinzelt vitale Tumorzellen vorhanden. Die der Tumornekrose (NT) anliegende Phagocytosezone (PZ) wird von zapfenförmig einwachsendem Granulationsgewebe (G) durchbrochen ($\uparrow$ mit nekrotischen Tumorzellen beladener Makrophag). b Tumornekrose auf sensiblen Tier (17. Tag). Die ans Wirtsgewebe grenzende Tumornekrose (NT) ruft keine sichtbare Reaktion im Sinne von Organisation und Resorption (vgl. Abb. 8a) hervor ($\uparrow$). (K Tumorkapsel)

kollagenen Bindegewebe, in dem man ebenfalls Lymphocytenhaufen und Makrophagen (vielfach hämosiderinhaltig) sieht.

b) *Bei sensiblen Tieren*, bei denen, neben dem vitalen, stark proliferierenden Tumorgewebe ebenfalls ausgedehnte, direkt an das Wirtsgewebe (Tumorkapsel) angrenzende Nekrosen auftreten, die sich morphologisch von nekrotischem Tumorgewebe auf resistenten Tieren nicht unterscheiden, ist auffallenderweise

eine *Organisation und Resorption* — wie sie oben für resistente Tiere dargestellt wurde — *nicht festzustellen* (Abb. 8b). Man findet höchstens vereinzelt kleine Gruppen von Makrophagen; Granulationsgewebe wird aber nicht gebildet.

Diskussion

1. Allgemeine Faktoren

Für eine umfassende Übersicht sei auf SPÄRCK (1962) verwiesen. Hier möchten wir nur eine mögliche Beeinflussung der Transplantationsreaktion des Wirtes durch mittransplantierte Pilze, Bakterien oder Viren sowie latente Infektionen der Wirtstiere erwähnen (KALISS et al., 1961). Wir haben unseren Tumor stichprobenweise auf seine bakteriologische Reinheit geprüft, ohne eine Kontamination mit Pilzen oder Bakterien festzustellen. Eine Beeinflussung der Transplantationsreaktion durch Viren ist jedoch nicht auszuschließen. Anzeichen für eine latente Infektion der Versuchstiere haben wir nie feststellen können.

2. Immungenetische Faktoren

Wie wir einleitend festgestellt haben, ist die genetische Grundlage der Transplantation von spezifischen Tumoren innerhalb isogener *Mäuse*stämme schon seit langem bekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt für die *Ratte*, daß auch bei der Transplantation von relativ unspezifischen Tumoren — zu denen das Walker-Carcinom gezählt werden muß — sich genetische Faktoren entscheidend auswirken können.

Aus verschiedenen Arbeiten (z. B. WRBA und RABES, 1962) geht hervor, daß sich bei der homologen Transplantation unspezifischer Tumoren immer ein gewisser Prozentsatz resistenter Tiere findet. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (MATTHIES und PFORDTE, 1961) gelang es, durch Selektion von sensiblen und resistenten Tieren und Inzucht derselben, in sehr kurzer Zeit (drei unserer Stämme reagierten schon in der ersten Inzuchtgeneration, in bezug auf Sensibilität und Resistenz, homogen) nahezu 100% sensible und 100% resistente Stammlinien herauszuzüchten. Diese Tatsache scheint der Definition der unspezifischen Transplantationstumoren zu widersprechen; denn von diesen wird angenommen, daß sie ihre antigene Spezifität bezüglich des homologen Transplantationssystems verloren haben. Die fortwährende Transplantation eines Tumors auf genetisch nicht einheitliche Tiere bewirkt eine Simplifizierung des Antigenmusters (MILGROM, 1961). KALISS et al. (1961) vermuten sogar eine Parallele zwischen zunehmender Malignität und Antigenverlust eines Tumors. GREENE (1952) hat eine direkte Beziehung zwischen Malignität und Heterotransplantabilität menschlicher Tumoren nachgewiesen. *Wie kann man sich aber vorstellen, daß ein unspezifischer Tumor eine gewisse Stammspezifität, wie sie auch bei unseren Versuchen zutage tritt, wieder erreichen kann?* Wir möchten hierzu MEDAWAR (1954) zitieren: „Der Verlust der antigenen Spezifität wurde als Folge von Mutationen aufgefaßt, aber GORER (1948) hebt hervor, daß es sich dabei um Umgruppierungen in der Antigenkonstitution handeln könnte, wobei der scheinbare Verlust eines Antigens nur ein zeitliches Verschwinden aus der Kompetition der anderen wäre.“ Diese Hypothese bildet eine mögliche Antwort auf die gestellte Frage.

Nach GREENE (1955) kann jedoch das mittransplantierte Tumorstroma eine Stamesspezifität vortäuschen: Es gibt Situationen, bei denen das im Transplantat vorhandene Stroma — das kein neoplastisches Element darstellt — sich vom Wirtsgewebe in genügendem Maße unterscheidet, um eine Transplantationsreaktion auszulösen, wodurch das Transplantat abstirbt, obschon das Parenchym oder das eigentliche neoplastische Element für den Wirtsorganismus an und für sich kompatibel gewesen wäre. Wir haben zur Zeit keine Anhaltspunkte dafür, inwieweit bei unserer Versuchsanordnung das Tumorstroma in diesem Sinne verantwortlich gemacht werden kann.

Die „Homograft Reaction“

Aus den Untersuchungen, vor allem der Histologie regredierender Tumoren, geht hervor, daß die resistenten Tiere bei Erstimplantation nach dem Modus der *„delayed type reaction“* reagieren, d.h. die das Transplantat zerstörende Reaktion des Wirtsgewebes tritt erst ca. 7 Tage nach der Implantation auf. Während dieser Phase findet eine immunologische Orientierung statt (s. a. STRÄULI, 1962). Bis zu diesem Zeitpunkt unterscheidet sich die Reaktion auf das implantierte Tumorgewebe von derjenigen auf ein Autotransplantat morphologisch nicht. Es kann angenommen werden, daß die genetischen und immunologischen Beziehungen eines Wirt-Transplantat-Systems für normales und neoplastisches Gewebe weitgehend dieselben sind (KALISS et al., 1961). Die Reaktion der resistenten Tiere wäre demnach als „Homograft Reaction“ zu betrachten. Der phasenspezifische Ablauf der Reaktion resistenter Tiere auf Walker-Carcinom-Implantate entspricht in der Tat der Beschreibung der „Homograft Reaction“ (MEDAWAR, 1954; SNELL, 1957).

Im Mittelpunkt des Interesses stehen bei der „Homograft Reaction“ die *sog. sensibilisierten Zellen des RES* (Lymphocyten und sehr wahrscheinlich noch andere Zellen). Einen allgemein akzeptierten Beweis für einen Kausalzusammenhang zwischen lymphocytärer Infiltration und Destruktion des Transplantates gibt es jedoch unseres Wissens noch nicht.

In Übereinstimmung mit VASILIEV (1956), der die Wirtsreaktion auf heterologe Tumortransplantate untersucht hat, stellen wir aber auch bei unserem Versuchsmaterial fest, daß die rundzellige Infiltration den degenerativen Veränderungen des Transplantates vorausgeht. Es erscheint somit auch uns unwahrscheinlich, daß diese eine Folge der Transplantatdegeneration ist. VASILIEV vermutet eine lokale Antikörperproduktion dieser Rundzellen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß sich beim spontan regredierenden Walker-Carcinom die rundzelligen Infiltrate primär fast ausschließlich auf die peripheren Anteile des Transplantates und des umliegenden Bindegewebes beschränken. Diese setzen sich vorwiegend aus kleinen Lymphocyten zusammen. In geringerer Zahl findet man auch größere Lymphocytenformen. Plasmazellen sieht man nur vereinzelt. Die Tumorperipherie wird fast nie von Lymphocyten allein infiltriert, sondern meistens von einem mit Lymphocyten und Makrophagen durchsetzten Granulationsgewebe: dadurch findet kein direkter Kontakt von Tumorzellen mit Lymphocyten statt. Da auch bei sensiblen Tieren nach ca. 1 Woche eine ausgeprägte Infiltration mit Lymphocyten festzustellen ist, nehmen wir an, daß ebenfalls

hier eine „Homograft Reaction“ zustande kommt, über die jedoch die Autonomie des Tumortransplantates dominiert.

Die Rolle der humoralen Antikörper bei der Transplantationsimmunität ist umstritten.

Vergleich der spontanen Tumorregression mit dibenzanthraceninduzierten Regressionen

Interessant erscheint uns, daß bei einer chemisch induzierten Regression die Verhältnisse offensichtlich anders sein können: BARUAH (1960) induzierte Regressionen des Walker-Carcinoms bei Ratten mit 1,2,5,6-Dibenzanthracen. Durch diese Behandlung erhielt er bei 25% seiner Tiere Regressionen und bei 40% eine deutliche Wachstumshemmung. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren fand er eine Zunahme der rundzelligen Infiltration, wobei jedoch nur der Anteil der Plasmazellen zunahm, die Zahl der Lymphocyten blieb ungefähr gleich. Dieses charakteristische Verhalten der Plasmazellen bei induzierten Regressionen ist im Vergleich zu spontanen Regressionen, wo Plasmazellen zahlenmäßig nur unbedeutend in Erscheinung treten, zu beachten.

3. Verschiedene Reaktionen sensibler und resistenter Tiere auf nekrotisches Tumorgewebe

Sehr auffallend ist die *unterschiedliche Reaktion des Bindegewebes* sensibler und resistenter Tiere auf unmittelbar angrenzendes *nekrotisches Tumorgewebe*. Sicher ist für dieses verschiedene Verhalten sensibler Tiere deren veränderter Reaktionslage Rechnung zu tragen; denn zum Zeitpunkt des Auftretens solcher Nekrosen befinden sich diese meistens in merklich reduziertem Allgemeinzustand. Es ist aber sehr wohl möglich, daß sich die Nekrosen resistenter und sensibler Tiere in ihren biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden und dadurch verschiedene Reaktionen auslösen. Über, zur Reaktion resistenter Tiere, analoge Vorgänge bei menschlichen Tumoren [verkalkende Epitheliome der Haut (MALHERBE) und Bronchialcarcinome] berichtet GIERSEBERG (1961).

Es wäre möglich, daß bei sensiblen Tieren im Zusammenhang mit dem Ausbleiben der lokalen Bindegewebsreaktion von nekrotischen Tumorbezirken relativ große Mengen toxischer Eiweißspaltprodukte in den Kreislauf gelangen und so für die starke Reduktion des Allgemeinzustandes und das Zustandekommen der häufigen Durchfälle dieser Tiere mitverantwortlich sind. Zur Stützung dieser Hypothese wurden bisher keine Versuche durchgeführt.

Zusammenfassung

Ausgehend von einer CFN-Rattenpopulation, die nicht in direkter Inzucht gehalten worden war, gelang es, Stammlinien zu isolieren, die gegen Walker-Carcinom-Implantate resistent reagierten; im Gegensatz dazu ließen sich auch Stammlinien züchten, bei denen nahezu 100% der Tiere an den Folgen des progressiven Tumorstadiums von implantiertem Walker-Carcinom zugrunde gingen. Durch ein geeignetes Selektionsverfahren ließen sich resistente Stämme gewinnen, bei denen bis zu 60% aller Tiere das Phänomen der Tumorregression zeigten. Parallel zum progressiven Tumorstadium trat bei *sensiblen* Tieren in zunehmendem Maße eine *letal verlaufende Diarrhoe* auf, was bei *resistenten* Tieren

in keinem einzigen Fall beobachtet werden konnte. Vergleichende histologische Studien von Tumorimplantaten auf sensiblen und resistenten Tieren haben ergeben, daß sich diese in der Regel erst *nach dem 7. Tag* unterscheiden, und zwar vor allem durch eine starke Zunahme der rundzelligen Infiltration auf resistenten Tieren, bei der zahlenmäßig die kleinen Lymphocyten dominieren. Das Tumorgewebe stirbt bei diesen, im Gegensatz zu sensiblen Tieren, in der Folge vollständig ab. Im weiteren wurde festgestellt, daß Tumornekrosen, die unmittelbar an Wirtsgewebe grenzten, bei resistenten Tieren ausgeprägte proliferative Veränderungen (im Sinne einer Fremdkörperreaktion) bewirkten, während bei sensiblen Tieren die Organisation nekrotischer Tumorbezirke völlig ausblieb.

Diverse Reactions of Genetically Different Strains of Rats to the Implantation of the Walker Carcinoma 256 (Demonstrated Histologically by Growth or Regression of the Carcinoma)

Summary

It was possible with a population of CFN rats, which had not been kept under conditions of direct inbreeding, to isolate lines that proved resistant to implantations of Walker Ca 256. In contrast, it was also possible to breed lines of rats in which 100% of the animals died as an effect of the progressive growth of the implanted tumor. By means of suitable procedures of selection, resistant lines were obtained in which up to 60% of all animals showed the phenomenon of tumor regression. In *sensitive* animals a *lethal diarrhea* developed concomitant with the progressive growth of the tumor; this was not observed in any of the *resistant* animals.

Comparative histological studies of tumor grafts of sensitive and resistant animals revealed that these generally do not develop any differences until *after the seventh day*, when infiltrations of round cells increase noticeably in resistant animals with a predominance of the small lymphocytes. The tumor tissue thus died completely, whereas in the sensitive animals it grew. In addition, it could be shown that in the resistant animals the necrotic tumor, which bordered the host tissue, induced pronounced proliferative changes (as a foreign body reaction), whereas in the sensitive animals no such changes in the host tissues were observed.

Herrn Prof. F. E. LEHMANN, der diese Arbeit angeregt hat, danke ich herzlich für die vielfältigen Ratschläge und sein Interesse, das er den Untersuchungen immer wieder entgegenbrachte. Zu großem Dank bin ich auch den Herren PD Dr. med. P. STRÄULI, Zürich, Pathologisches Institut, Prof. H. COTTIER, Bern, Pathologisches Institut, und Prof. E. F. LÜSCHER, Bern, Theodor-Kocher-Institut, verpflichtet, die den Fortgang der Arbeit durch praktische Hinweise und anregende Kritik in mancher Hinsicht bereichert haben.

Literatur

- BARUAH, B. D.: Cellular reactions following tumor growth with special reference to plasma-cellular response. *Cancer Res.* **20**, 1184—1194 (1960).
 BENZ, G., u. F. E. LEHMANN: Das Verhalten gewebseigener Proteasen aus normalen und malignen Geweben der Ratte. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **17**, 380—420 (1959).
 CLOUDMAN, A. M.: A comparative study of transplantability of eight mammary gland tumors arising in inbred mice. *Amer. J. Cancer* **16**, 568—630 (1932).

- EARLE, W. R. A.: A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 in vivo and vitro. Amer. J. Cancer **24**, 566—612 (1935).
- FROHBERG, H., u. E. MATTHIES: Erfolgreiche Transplantation des Guérin-Carcinoms auf tumorresistente Ratten. Naturwissenschaften **44**, 496 (1957).
- GIEBERSBERG, O.: Über Organisationsvorgänge in Tumoren. Z. Krebsforsch. **65**, 24—29 (1962).
- GORER, P. A.: Brit. J. Cancer **2**, 103 (1948). Zit. P. B. MEDAWAR, General problems of immunity. Preservation and transplantation of normal tissues. Ciba Found. Symp. 10—11 (1954).
- GREENE, H. S. N.: The significance of heterologous transplantability of human cancer. Cancer (Philad.) **5**, 24—44 (1952).
- Compatibility and non-compatibility in tissue transplantation. Biological specificity and growth (E. G. BUTLER). Princeton: Princeton University press 1955.
- KALISS, N., and B. ROSCOE: The transplanted tumor as a research tool in cancer immunology. Cancer Res. **21**, 1203—1208 (1961).
- LEHMANN, F. E., u. V. MEYER: Über definierte tumortolerante und tumorresistente CFN-Rattenstämme. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **38**, 76—86 (1963).
- — Biological problems of growth and tissue regression in tumors and in regenerates. Int. Symp. Regeneration in animals and related problems, Athens 1964 p. 474—477. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1965.
- S. SCHMIDT u. H. P. VON HAHN: Das organotypische Verteilungsmuster der Aktivitäten von Kathepsin, Leucinaminopeptidase und saurer Phosphatase bei der Ratte. Helv. physiol. pharmacol. Acta **23**, 149—155 (1965).
- LITTLE, C. C.: A possible mendelian explanation for a type of inheritance apparently non-mendelian in nature. Science **40**, 904—906 (1914). Zit. G. D. SNELL, Transplantable tumors. The physiopathology of cancer, 2nd ed., p. 302 (F. HOMBURGER). London: Ed. Cassel & Co. Ltd 1958.
- The genetics of tumortransplantation. Biology of the laboratory mouse (G. D. SNELL). Philadelphia 1941.
- The genetics of cancer in mice. Biol. Rev. **22**, 315—343 (1947).
- MATTHIES, E., u. K. PFORDE: Papierelektrophoretische Serumuntersuchungen an gegen Walker-Carcinom resistenten Ratten. Naturwissenschaften **48**, 433 (1961).
- MEDAWAR, P. B.: General problems of immunity. Preservation and transplantation of normal tissues. Ciba Found. Symp. p. 1—22 (1954).
- MILGROM, F.: A short review of immunological investigations on cancer. Cancer Res. **21**, 862—868 (1961).
- SCHRECK, K.: A quantitative study of the growth of the Walker rat tumor and the Flexner-Jobling rat carcinoma. Amer. J. Cancer **24**, 807—822 (1935).
- SNELL, G. D.: Methods for the study of the histocompatibility genes. J. Genet. **49**, 87—108 (1948).
- The homograft reaction. Ann. Rv. Microbiol. **11**, 439—458 (1957).
- SPÄRCK, J. V.: Immunity and host response in the growth of transplanted tumors. Phil. nat. Diss. Kopenhagen 1962.
- STRÄULI, P.: Krebs und Organismus (Immunologie). Helv. med. Acta **29**, 425—436 (1962).
- SYMEONIDIS, A.: Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Tumorimmunität. II. Die mikroskopischen Erscheinungen und das Wesen des Tumorimmunitätsvorganges an der Impfstelle. Virchows Arch. path. Anat. **304**, 271—295 (1939).
- VASILJEV, J. M.: Connective tissue reaction in homologous and heterologous tumor transplantations. Probl. Oncol. (N. Y.) **4**, 9—15 (1958).
- WRBA, H., u. H. RABES: Zur natürlichen Resistenz gegen Impftumoren. Z. Krebsforsch. **65**, 17—23 (1962).

Dr. med. VIKTOR MEYER
 Zoologisches Institut
 Abteilung für Entwicklungs- und Tumorbiologie der Universität
 CH 3000 Bern (Schweiz), Sahlistr. 8

